

整理番号:336N03106 特願2003-388637 (Proof) 提出日:平成15年11月19日 1/E

【書類名】 特許願
【整理番号】 336N03106
【提出日】 平成15年11月19日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12M 3/00
C12N 5/00
C12N 11/14

【発明者】
【住所又は居所】 愛知県名古屋市守山区大字下志段味字穴ヶ洞 2 2 6 6 番地の 9 8
独立行政法人産業技術総合研究所中部センター内
【氏名】 寺岡 啓
【発明者】
【住所又は居所】 愛知県名古屋市守山区大字下志段味字穴ヶ洞 2 2 6 6 番地の 9 8
独立行政法人産業技術総合研究所中部センター内
【氏名】 斎藤 隆雄
【特許出願人】
【識別番号】 301021533
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所
【代表者】 吉川 弘之
【連絡先】 部署名 独立行政法人産業技術総合研究所 産学官連携部門中部
産学官連携センター 担当者 杉浦宏幸 電話番号 052-
736-7058

【その他】 国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成15年度、経済産業
省、科学技術総合研究委託費、産業活力再生特別措置法第30条
の適用を受けるもの）

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

細胞育成中の細胞培養容器内の細胞集合体（細胞採取 site）に微小成形体を留置することにより、細胞育成に資する液性成分（細胞育成環境）を微小成形体に取り込むと共に、細胞を微小成形体側に接着、増殖させて（受動的細胞採取）、得られた微小成形体－細胞複合体を用いて、細胞を微小成形体ごとハンドリング操作する方法であって、

（1）微小成形体を、細胞採取 site に留置する行程、

（2）微小成形体に、細胞採取 site の細胞育成環境を、微小成形体側に取り込ませる行程、

（3）微小成形体に取り込ませた細胞育成環境中に、細胞を浸潤・増殖させ、微小成形体－細胞複合体を調製する行程（受動的細胞採取）、

（4）上記微小成形体－細胞複合体を回収し、任意の培養環境に移動する行程、及び

（5）任意に、上記培養環境で細胞を培養する行程、

からなることを特徴とする細胞操作方法。

【請求項2】

細胞採取 site が、任意の細胞が 1×10^2 cells/cm² 以上で接着している培養容器内の細胞集積体である、請求項1に記載の細胞操作方法。

【請求項3】

細胞育成環境が、培地、血清、血液、体液、蛋白、ゼラチン、コラーゲン、及び生体部位成分の群から選択された1種、あるいは2種以上の混合物である、請求項1に記載の細胞操作方法。

【請求項4】

微小成形体が、気孔、貫通孔、ディンプル、突起結合部分が形成する節、表面吸着蛋白、親水処理表面、ポリマーコート、及び酸化物被膜の群から選択された1種、あるいは2種以上の構造を持つ成形体である、請求項1に記載の細胞操作方法。

【請求項5】

微小成形体が、アスペクト比（長軸／短軸）1.005～5の断面を持つ形状であり、平面に静置したときに、上記気孔、貫通孔、又はディンプルの開口部の一部もしくは全部が下方を向くものである、請求項4に記載の細胞操作方法。

【請求項6】

微小成形体が、 5×10^{-4} から 1×10^3 mm³ の、球状、ビーズ状、塊状、板状、多面体状、いがくり状、樹枝状、及び有突起形状の群から選択された1種、あるいは2種以上の混合成形体である、請求項1に記載の細胞操作方法。

【請求項7】

細胞を、採取、播種、及び／又は継代する、請求項1から6のいずれかに記載の細胞操作方法。

【請求項8】

異なる培養環境にある2種類以上の細胞を、同一培養環境に移動し、共培養（co-culture）する、請求項1から6のいずれかに記載の細胞操作方法。

【請求項9】

微小成形体－細胞複合体を、2次元もしくは3次元集積物として3次元細胞集合体とする、請求項1から6のいずれかに記載の細胞操作方法。

【請求項10】

微小成形体に採取した細胞を分化させることにより、微小成形体－分化細胞複合体を得る、請求項1から6のいずれかに記載の細胞操作方法。

【請求項11】

請求項1から6のいずれかに記載された細胞操作方法により調製された、細胞を微小成形体側に接着、増殖させたことを特徴とする微小成形体－細胞複合体。

【請求項12】

請求項1から6のいずれかに記載の細胞操作方法に使用するための微小成形体であって

、気孔、貫通孔、ディンプル、突起結合部分が形成する節、表面吸着蛋白、親水処理表面、ポリマーコート、及び酸化物被膜の群から選択された1種、あるいは2種以上の構造を持つ微小成形体からなることを特徴とする細胞操作用微小成形体。

【書類名】明細書

【発明の名称】微小成形体を用いた細胞操作方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞を微小成形体を用いてハンドリング操作する方法に関するものであり、更に詳しくは、細胞育成中の細胞培養容器内の細胞集合体（細胞採取 site）に微小成形体を留置することにより、細胞育成に資する液性成分（細胞育成環境）を微小成形体に取り込むと共に、細胞を微小成形体側に接着、増殖させて（受動的細胞採取）、得られた微小成形体－細胞複合体を用いて、細胞を微小成形体ごとハンドリング操作する、細胞操作方法に関するものである。

本発明は、生体細胞の培養方法及び該方法で作製された培養細胞の利用の技術分野において、従来法のように、例えば、シャーレ上に培養された細胞を、トリプシン等の細胞剥離剤で剥離する行程を必要とすることなく採取することができること、また、細胞を採取した微小成形体を移動することにより、細胞を任意の細胞育成環境に播種、継代することができること、また、微小成形体に複合化された細胞を、簡便な操作により2次元もしくは3次元集積物とすることができること、更に、異なる細胞を、それぞれに適した育成環境を保持した微小成形体ごと1箇所集積し、培養することができること、等の従来法にない優れた特徴を有する新しい細胞操作方法（細胞ハンドリングシステム）を提供するものとして有用である。

本発明の細胞操作方法是、例えば、医療技術、ゲノムサイエンスに資する細胞研究分野における、新しい細胞操作技術を提供するものであり、例えば、低侵襲な細胞採取・継代、3次元細胞培養、細胞療法、共培養（co-culture）における新しい細胞操作方法等として好適に利用し得るものである。

【背景技術】

【0002】

バイオテクノロジーを支える基礎技術として蓄積されてきた細胞培養技術は、例えば、組織工学（Tissue Engineering）、再生医療、及び創薬の分野における細胞操作の強力なツールであり、これらの分野において、培養細胞は、しばしばハンドリング可能なシート状もしくは凝集形態であることが望まれる。今日、最も普遍的に行われている細胞培養様式は、カルチャーディッシュやシャーレ等の培養容器上での2次元培養である。2次元培養系では、細胞は、培養容器底面に接着するため、増殖に関して有利である一方、培養細胞は、培養容器に強く拘束される。従って、2次元培養系で培養された細胞を、継代、運用する際には、トリプシン処理等の細胞剥離剤による処理により細胞を培養容器から剥離する行程が不可欠である。しかしながら、上記方法によると、培養細胞は、細胞剥離剤によるダメージを免れないという問題がある。また、上記方法においては、細胞外マトリックス（ECM）が失われるため、培養細胞を有用な形態（シート状、塊状）で回収すること、及びその細胞分化能を維持すること、が極めて困難であるという問題がある。

【0003】

上記問題点を解決する従来方法として、例えば、懸濁細胞をマイクロキャリアー表面に付着させて培養する方法（例えば、非特許文献1、特許文献1）がある。しかし、上記方法においては、培養細胞を懸濁液とする行程が不可避であり、かつ細胞は物理的刺激（容器との衝突や、ハンドリング）を免れることがないため、多くの細胞が死に至る。また、マイクロキャリアー表面は凸面であるため、細胞を高密度凝集塊に仕上げるのが困難である。他の方法として、例えば、細胞をアルギン酸カルシウム等のゲルでカプセル化して培養する方法も報告されている（例えば、特許文献2）。しかし、上記方法においても、培養細胞を懸濁液とする行程が不可避であり、何段階にも及ぶ複雑なカプセル化作業の際に多くの細胞が死に至る。また、ゲルカプセルが細胞を完全に被覆してしまうため、十分なガス交換ができず、長期培養が困難である。更に、ゲルカプセルの強度不足のため、ハンドリングが困難である。

【0004】

近年、特に、再生医療分野において、培養細胞を有用な形態（シート状、塊状）で回収する方法が強く求められている。上記要求に答える技術として、細胞を細胞非接着物質上で浮遊培養する方法、もしくは細胞弱接着基材上から自然剥離した細胞を凝集させる方法が報告されている。また、上記方法に関連して、32℃以上の温度で収縮するPoly(N-isopropyl acrylamide) 薄層上で細胞を培養し、コンフルエントになったところで加熱し、シート状細胞を回収する方法が報告されている（例えば、非特許文献2）。また、遠心による細胞ペレット化と、ペレット化細胞の浮遊培養を繰り返すことにより、高密度細胞凝集塊を得る方法が研究されている（例えば、Y. Kato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 9552, 1988）。しかし、上記方法により作製された細胞シート及び細胞凝集塊は、非常にデリケートであり、例えば、ピンセット等によるハンドリングを要求される臨床応用には耐えない。

【0005】

【特許文献1】特開昭59-67965号公報

【特許文献2】特開平10-248557号公報

【非特許文献1】L. Ikonomou et al., BIOTECHNOLOGY PROGRESS 18 (6), p.1345-1355 NOV-DEC 2002

【非特許文献2】T. Okano et al., J. Biomed. Mater. Res., Vol. 27, p. 1243-1251, 1993

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

このような状況の中で、本発明者は、上記従来技術に鑑みて、上記従来技術における諸問題を確実に解消することができる新しい細胞操作技術とその新しい利用形態及びその製品を、多角的な視点から検討し、鋭意研究を積み重ねた結果、培養細胞、細胞凝集塊、生体組織の一部もしくは全部を、所定の細胞育成環境を取り込んだ微小成形体に受動的に採取し、細胞を微小成形体ごとハンドリング操作する方法を採用することにより所期の目的を達成し得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、適宜の培養環境にある培養細胞を、培養環境ごと微小成形体に移し取り、微小成形体ごと目的の培養環境に移動することができる細胞操作方法（ハンドリングシステム）を提供することを目的とするものである。

また、本発明は、上記方法により、シャーレ上等の培養容器内に培養された細胞を他の培養環境で継代する方法を提供することを目的とするものである。

また、本発明は、複数の培養細胞を、それぞれの培養環境を保持した微小成形体ごと、単一目的の培養環境に移動・留置することにより、共培養（co-culture）する方法を提供することを目的とするものである。

また、本発明は、例えば、細胞育成環境を保持した微小成形体の凹構造等を利用して、適宜の細胞の凝集塊を形成する方法を提供することを目的とするものである。

更に、本発明は、例えば、細胞育成環境を保持した微小成形体の凹構造等に形成された細胞凝集塊を、微小成形体ごと生体用注入・充填剤とする用途を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題を解決するための本発明は、以下の技術的手段から構成される。

(1) 細胞育成中の細胞培養容器内の細胞集合体（細胞採取 site）に微小成形体を留置することにより、細胞育成に資する液性成分（細胞育成環境）を微小成形体に取り込むと共に、細胞を微小成形体側に接着、増殖させて（受動的細胞採取）、得られた微小成形体-細胞複合体を用いて、細胞を微小成形体ごとハンドリング操作する方法であって、

1) 微小成形体を、細胞採取 site に留置する行程、

2) 微小成形体に、細胞採取 site の細胞育成環境を、微小成形体側に取り込ませる行程、

3) 微小成形体に取り込ませた細胞育成環境中に、細胞を浸潤・増殖させ、微小成形体－細胞複合体を調製する行程（受動的細胞採取）、

4) 上記微小成形体－細胞複合体を回収し、任意の培養環境に移動する行程、及び

5) 任意に、上記培養環境で細胞を培養する行程、

からなることを特徴とする細胞操作方法。

(2) 細胞採取 site が、任意の細胞が 1×10^2 cells/cm² 以上で接着している培養容器内の細胞集積体である、前記(1)に記載の細胞操作方法。

(3) 細胞育成環境が、培地、血清、血液、体液、蛋白、ゼラチン、コラーゲン、及び生体部位成分の群から選択された1種、あるいは2種以上の混合物である、前記(1)に記載の細胞操作方法。

(4) 微小成形体が、気孔、貫通孔、ディンプル、突起結合部分が形成する節、表面吸着蛋白、親水処理表面、ポリマーコート、及び酸化物被膜の群から選択された1種、あるいは2種以上の構造を持つ成形体である、前記(1)に記載の細胞操作方法。

(5) 微小成形体が、アスペクト比（長軸／短軸）1.005～5の断面を持つ形状であり、平面に静置したときに、上記気孔、貫通孔、又はディンプルの開口部の一部もしくは全部が下方を向くものである、前記(4)に記載の細胞操作方法。

(6) 微小成形体が、 5×10^{-4} から 1×10^3 mm³ の、球状、ビーズ状、塊状、板状、多面体状、いがり状、樹枝状、及び有突起形状の群から選択された1種、あるいは2種以上の混合成形体である、前記(1)に記載の細胞操作方法。

(7) 細胞を採取、播種、及び／又は継代する、前記(1)から(6)のいずれかに記載の細胞操作方法。

(8) 異なる培養環境にある2種類以上の細胞を、同一培養環境に移動し、共培養 (co-culture) する、前記(1)から(6)のいずれかに記載の細胞操作方法。

(9) 微小成形体－細胞複合体を、2次元もしくは3次元集積物として3次元細胞集合体とする、前記(1)から(6)のいずれかに記載の細胞操作方法。

(10) 微小成形体に採取した細胞を分化させることにより、微小成形体－分化細胞複合体を得る、前記(1)から(6)のいずれかに記載の細胞操作方法。

(11) 前記(1)から(6)のいずれかに記載された細胞操作方法により調製された、細胞を微小成形体側に接着、増殖させたことを特徴とする微小成形体－細胞複合体。

(12) 前記(1)から(6)のいずれかに記載の細胞操作方法に使用するための微小成形体であって、気孔、貫通孔、ディンプル、突起結合部分が形成する節、表面吸着蛋白、親水処理表面、ポリマーコート、及び酸化物被膜の群から選択された1種、あるいは2種以上の構造を持つ微小成形体からなることを特徴とする細胞操作微小成形体。

【0008】

次に、本発明について更に詳細に説明する。

本発明において、細胞は、好適には、細胞培養中の培養容器内の細胞集合体（細胞採取 site）、例えば、2次元培養されたカルチャーディッシュ内の任意の細胞の sub-confluent～confluent、カルチャーディッシュ内の 1×10^4 個以上の細胞からなる細胞凝集塊、浮遊培養系にて形成された細胞シート表面、から採取される。上記培養容器は、細胞増殖の点で好適である。しかし、これらに制限されるものではなく、これらと実質的に同効のもの、あるいはこれらと類似のものであれば同様に使用することができる。上記細胞採取 site には、いずれも、当該細胞に適した培地が含まれる。培地中には、必要に応じて、例えば、 1×10^6 cells/ml 程度の細胞等を懸濁させることがある。本発明では、細胞は、上記から選択された1箇所、あるいは2箇所以上の細胞採取 site から採取される。

【0009】

細胞の採取は、上記細胞採取 site に、微小成形体を投入することにより行われる。

微小成形体は、上記細胞採取 site に滅菌状態で投入される。滅菌方法としては、例え

ば、オートクレーブ滅菌、ガス滅菌、乾熱滅菌、及び紫外線滅菌が例示されるが、これらに制限されるものではなく、これらと実質的に同効のもの、あるいはこれらと類似のものであれば同様に使用することができる。上記のように、微小成形体が投入された細胞採取 site は、適宜の環境に設定されたインキュベータ内に留置される。上記作業において、留置期間は適宜でよいが、好適には、6～240時間であることが望ましい。カルチャーディッシュ (Culture Dish) 内の細胞採取 site に投入された微小成形体は、細胞採取 site の細胞育成に資する液性成分 (細胞育成環境)、例えば、血清を含む培地の培地成分、血清を、微小成形体表面及び内部に取り込み、細胞と接する (図1)。微小成形体と接した細胞は、微小成形体表面を足場として接着、増殖し、微小成形体と共に移動することができるようになる (微小成形体による受動的細胞採取)。このとき、微小成形体は、数百ミクロンの貫通孔もしくは凹構造を持つ多孔体であることが、液性成分保持及び細胞浸潤の観点から望ましい (図2)。また、微小成形体は、例えば、 5×10^{-4} から $1 \times 10^3 \text{ mm}^3$ 程度の大きさであることが、細胞密度向上、ハンドリングの観点から好適である。

【0010】

微小成形体は、例えば、リン酸カルシウム系セラミックス (例えば、水酸アパタイト、 β -TCP 等)、及びその単結晶、ポリスチレン、コラーゲンゲル、適宜の濃度でリン酸カルシウムを含有した寒天製であることが、受動的細胞採取の観点から好適であるが、これらに制限されるものではなく、これらと実質的に同効のもの、あるいはこれらと類似のものであれば同様に使用することができる。上記のように、微小成形体に採取された細胞は、増殖を続け、confluent に達する。特に、微小成形体の貫通孔もしくは凹構造においては、細胞は、上記構造を充填するように増殖し、細胞凝集塊を形成するに至る (図3)。

【0011】

微小成形体内に採取された細胞は、増殖の過程において、微小成形体外に漏出する (図4)。また、このとき、微小成形体同士が隣接している場合、微小成形体は、増殖した細胞により架橋され、任意の構造を保つことができる。すなわち、本発明による細胞操作方法は、好適には、例えば、滅菌した微小成形体を、細胞採取 site に留置し、微小成形体に細胞採取 site の細胞育成環境を取り込む行程、細胞を微小成形体に浸潤させ、増殖させる行程、細胞が浸潤・増殖した微小成形体を回収し、他の培養環境に移動する行程、上記培養環境で細胞を培養する行程、により実施される。これにより、微小成形体内に採取された細胞が、移動先にて微小成形体外に漏出することにより、任意の細胞を、目的の培養環境に播種、継代することができる。また、微小成形体に採取した任意の細胞を、微小成形体ごと3次元的に組み上げることにより、3次元細胞培養系、及び3次元細胞構造を持つ細胞凝集塊とすることができる。しかし、本発明は、これらの方法に制限されるものではない。

【0012】

本発明は、適宜の方法、例えば、増殖に関して有利なカルチャーディッシュを用いた2次元培養方法、で培養された細胞を、微小成形体に受動的に採取することにより、培養細胞を効率的、かつ有効に操作し、様々な用途に適用するものである。従来方法によれば、培養細胞は、一旦、トリプシン等の細胞剥離剤により、培養容器から剥がされ、細胞懸濁液に調整され、様々な用途に適用される。しかし、細胞剥離剤で回収された培養細胞は、細胞増殖・分化等に寄与する細胞外マトリックス (ECM) をほぼ失っており、例えば、細胞療法、ティッシュエンジニアリング等への適用に適さない。一方、本発明によれば、細胞剥離剤を用いることなく、培養細胞をハンドリング操作可能な微小成形体に採取することができる。細胞剥離剤を用いない本発明の方法は、細胞に対して低侵襲であり、かつ得られた培養細胞は、有用なECMを豊富に保持している。更に、本発明によれば、微小成形体に採取された細胞は、微小成形体中においても増殖を続けるため、長期にわたって生存する高密度細胞凝集塊を作製することができる。

【0013】

微小成形体に採取された細胞は、微小成形体ごと移動することができる。特に、微小成形体の貫通孔もしくは凹構造に採取された細胞においては、従来法の場合のように、ピンセット等によるハンドリングに伴うダメージがない。また、微小成形体が細胞育成に必要な液性成分を保持しているため、移動中に細胞が乾燥することがない。従って、本発明によれば、培養細胞を、細胞療法、ティッシュエンジニアリング等に関して有用な形態で回収することができる。また、細胞を採取した微小成形体を、所望の3次元構造に組み上げることにより、3次元細胞培養系、及び3次元構造培養細胞を組み上げることができる。

【0014】

本発明の細胞ハンドリングシステムを駆使することにより、例えば、培養細胞を採取した微小成形体を新たなシャーレに移動することにより、細胞の継代、播種をより低侵襲に行うことができる。また、適宜の培養方法で培養された異なる細胞を、本発明の細胞ハンドリングシステムにより採取し、任意の培養環境に移動することにより、共培養 (co-culture) を行うことができる。更に、再生したい組織を構成する細胞を採取した微小成形体を、治療対象領域に確実に留置し、組織再生をバックアップすることができる (細胞療法)。例えば、骨細胞もしくは骨に分化する可能性のある細胞を、リン酸カルシウム微小成形体 (水酸アパタイト等) に採取した場合、それらを硬組織再生用注入剤とすることができる。

【0015】

本発明の細胞ハンドリングシステムは、これを滅菌梱包したキットとして製品化される。例えば、微小成形体を適宜の袋やカプセルの空間にバックして充填物を調製し、これを滅菌、梱包し、適宜の細胞培養環境と組合せて、所定の製品とすることができる。この場合、微小成形体を、適宜の細胞培養環境と混合して充填物とすることができる。また、本発明では、上記微小成形体に任意の薬剤成分を担持させて充填物とすることができる。これらの任意の薬剤成分として、例えば、抗生物質、抗炎症剤、血小板濃厚血漿、及びBMPなどが例示される。しかし、これらに制限されるものではなく、適宜の薬剤成分を担持させることができる。

【発明の効果】

【0016】

本発明は、細胞育成中の細胞培養容器内の細胞集合体 (細胞採取 site) に微小成形体を留置することにより、細胞育成に資する液性成分 (細胞育成環境) を微小成形体に取り込むと共に、細胞を微小成形体側に接着、増殖させて (受動的細胞採取)、得られた微小成形体-細胞複合体を用いて、細胞を微小成形体ごとハンドリング操作することを可能とする新しい細胞培養操作技術に係るものであり、本発明により、(1)トリプシン等の細胞剥離剤を用いることなく、培養細胞を採取、移動、播種することができる、(2)上記操作は、細胞に対して低侵襲である、(3)上記操作を駆使することにより、細胞継代を簡便に行うことができる、(4)上記操作を駆使することにより、3次元構造を持つ細胞凝集塊を作製することができる、(5)上記操作を駆使することにより、複数の培養細胞を、任意の一カ所に集め、共培養 (co-culture) することができる、(6)上記操作における、細胞凝集塊は、直感的なハンドリングが可能であり、再生医療に対応する生体用注入・充填剤として有用である、という格別の作用効果が奏される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

次に、実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例によって何ら限定されるものではない。

【実施例1】

【0018】

直径500 μ mの貫通孔を設けた直径1.8mmのアパタイトゲル球を、1200℃で90分焼結することにより、HA微小成形体を得た。この微小成形体を、99.5%エタノール中にて10分間超音波洗浄した。ヒト骨肉腫細胞MG63を、6well (直径9

・6 cm²

／well) のカルチャーディッシュ中で培養し、サブコンフルエント状態とした。上記培養においては、ダルベッコMEM+10%FBS+1%P. S. を培地として使用した。200℃で2時間乾熱滅菌したHA微小成形体を、20個／wellで上記カルチャーディッシュ中に投入し、37℃、5%CO₂

のインキュベータ内に静置した。上記作業により、カルチャーディッシュ上のMG63を、HA微小成形体に採取することができた(図5)。HA微小成形体へのMG63採取量は、経時的に増加し、24、72、120時間後、それぞれ537、2970、4728 cells／HA微小成形体となった(図6)。HA微小成形体へのMG63採取量は、HA微小成形体中のDNA量から求めた。HA微小成形体に採取されたMG63のViability(生細胞率)は95%以上であった。MG63を採取したHA微小成形体を、12wellのカルチャーディッシュに移動し、ダルベッコMEM+10%FBS+1%P. S. を培地としてインキュベータ内に静置した。上記作業により、12wellのカルチャーディッシュにMG63を播種することができた(図7)。

【実施例2】

【0019】

実施例1で作製した、MG63を採取したHA微小成形体60個を、96wellのカルチャーディッシュに移動し、HA微小成形体を三次元的に配置し、インキュベータ内に48時間静置した。その結果、隣り合うHA微小成形体同士を、増殖したMG63により架橋することができた。

【実施例3】

【0020】

実施例1において、MG63に変えてマウス骨芽細胞株MC3T3-E1を用いた他は、実施例1と同様の方法で、マウス骨芽細胞株MC3T3-E1を採取したHA微小成形体を作製した。上記MC3T3-E1を採取したHA微小成形体と、実施例1で作製した、MG63を採取したHA微小成形体を、それぞれ8個が交互配置になるように12wellのカルチャーディッシュ上に配置した。その結果、MC3T3-E1とMG63が交互配置に播種された共培養系を作製することができた。上記共培養系は、14日間の間、鏡下で確認できる両細胞の明瞭な境界を保つことができた。

【実施例4】

【0021】

ヒト骨肉腫細胞MG63を、寒天培地(細胞非接着培地)上で培養し、MG63の細胞シート(Cell Sheet)を作製した。上記培養においては、ダルベッコMEM+10%FBS+1%P. S. を培地(血清を含む培地)として使用した。上記細胞シート上に、実施例1で作製した滅菌HA微小成形体を投下し、24時間インキュベータ内に静置することにより、MG63で被覆されたHA微小成形体を作製することができた(図8)。上記作業において、HA微小成形体を1個/mm²となるように投下し、24時間インキュベータ内に静置することにより、3次元ネットワーク構造を持つMG63凝集塊を形成することができた。

【産業上の利用可能性】

【0022】

本発明は、培養細胞を、微小成形体に受動的に採取し、微小成形体ごと移動することを特徴とする細胞ハンドリングシステムに係るものであり、本発明により、シャーレ内等の細胞採取siteに培養された細胞を、細胞剥離剤で剥離することなく、採取し、細胞を任意の細胞育成環境に播種、継代することができる。本発明の方法は、細胞に対して低侵襲であり、かつ有用なECMを損なうことなく培養細胞を運用することができる。また、本発明によれば、微小成形体を組み上げることにより、微小成形体に複合化された細胞を2次元もしくは3次元集積物とすることができる。更に、本発明によれば、例えば、異なる細胞を、それぞれに適した育成環境を保持した微小成形体ごと1箇所に集積し、培養することができる。本発明の細胞ハンドリングシステムは、低侵襲な細胞採取・継代、3次

元細胞培養、細胞療法、及び共培養 (co-culture) 方法等を実現し得るものとして有用である。本発明により、例えば、組織工学 (Tissue Engineering)、再生医療、及び創薬の分野における細胞操作の新しいツールとなり得る新技術を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】微小成形体が、カルチャーディッシュ (Culture Dish) 内の細胞採取 site に投入され、血清を含む培地成分を、その表面及び内部に取り込み、培養細胞と接した状態の模式図を示す。

【図2】微小成形体と接した細胞が、微小成形体表面を足場として接着、増殖する様子 (微小成形体による受動的細胞採取) の模式図を示す。

【図3】微小成形体に採取された細胞が増殖を続け、confluent に達し、細胞凝集塊を形成するに至った状態の模式図を示す。

【図4】微小成形体内に採取された細胞が、微小成形体外に漏出する様子の模式図を示す。

【図5】HA微小成形体に採取された、カルチャーディッシュ上のMG63の光学顕微鏡写真の一例を示す。

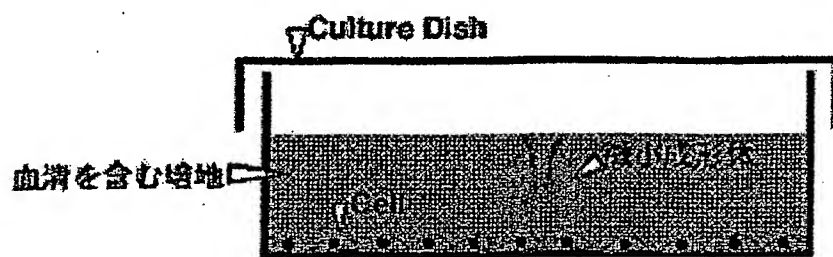
【図6】HA微小成形体に採取されたMG63数の経時変化を示すグラフを示す。

【図7】MG63を採取したHA微小成形体により播種されたMG63細胞の、光学顕微鏡写真の一例を示す。

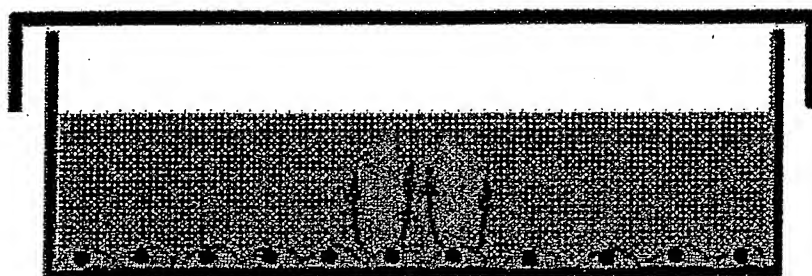
【図8】カルチャーディッシュ (Culture Dish) 内の細胞シート (Cell Sheet) 上にHA微小成形体を投下し、24時間インキュベータ内に静置することにより、MG63で被覆されたHA微小成形体を作製する方法を模式的に示す。

【書類名】図面

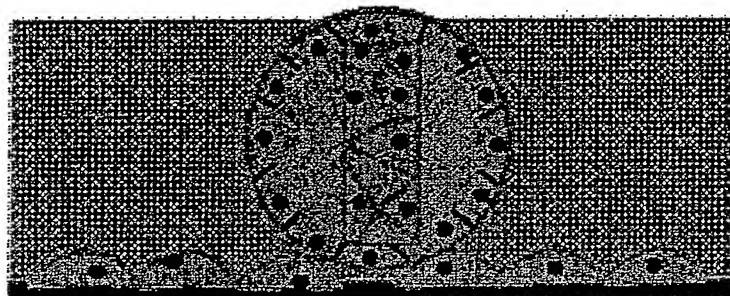
【図1】



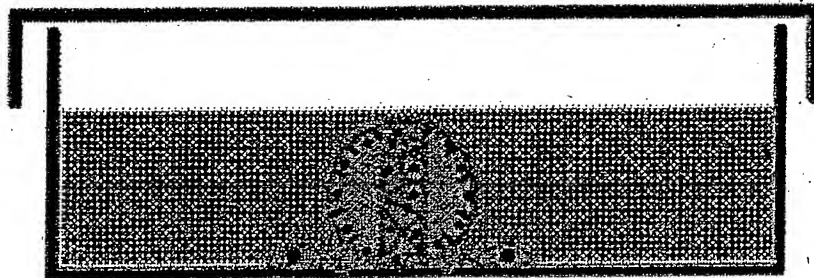
【図2】



【図3】



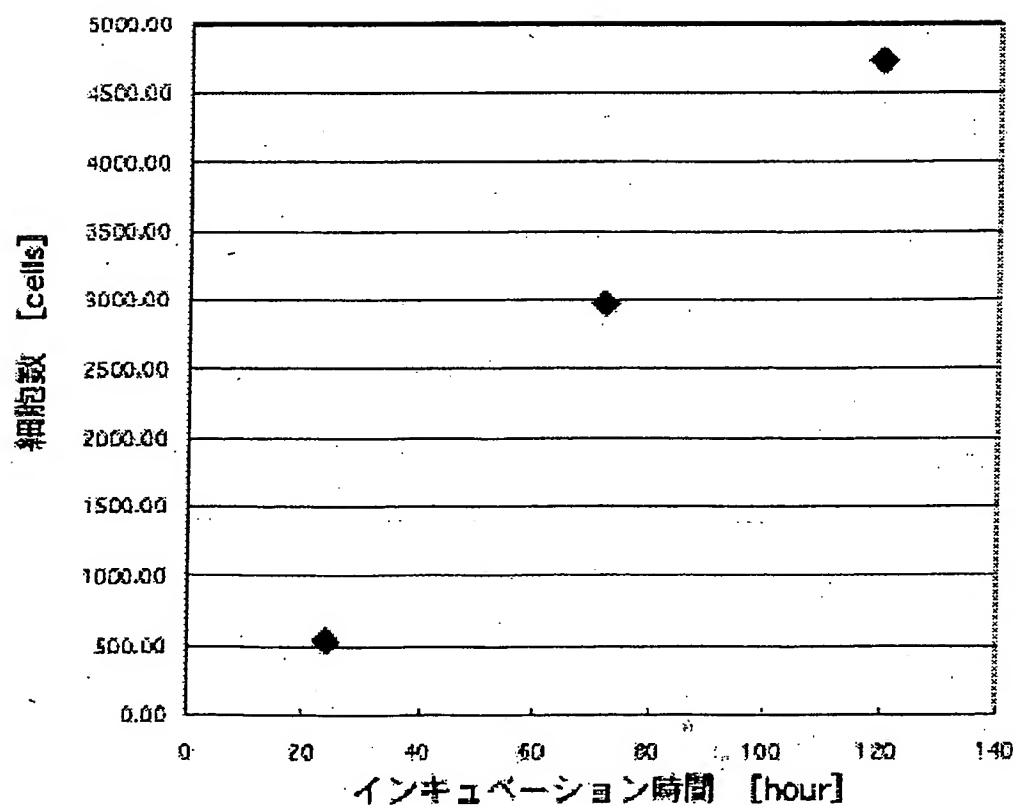
【図4】



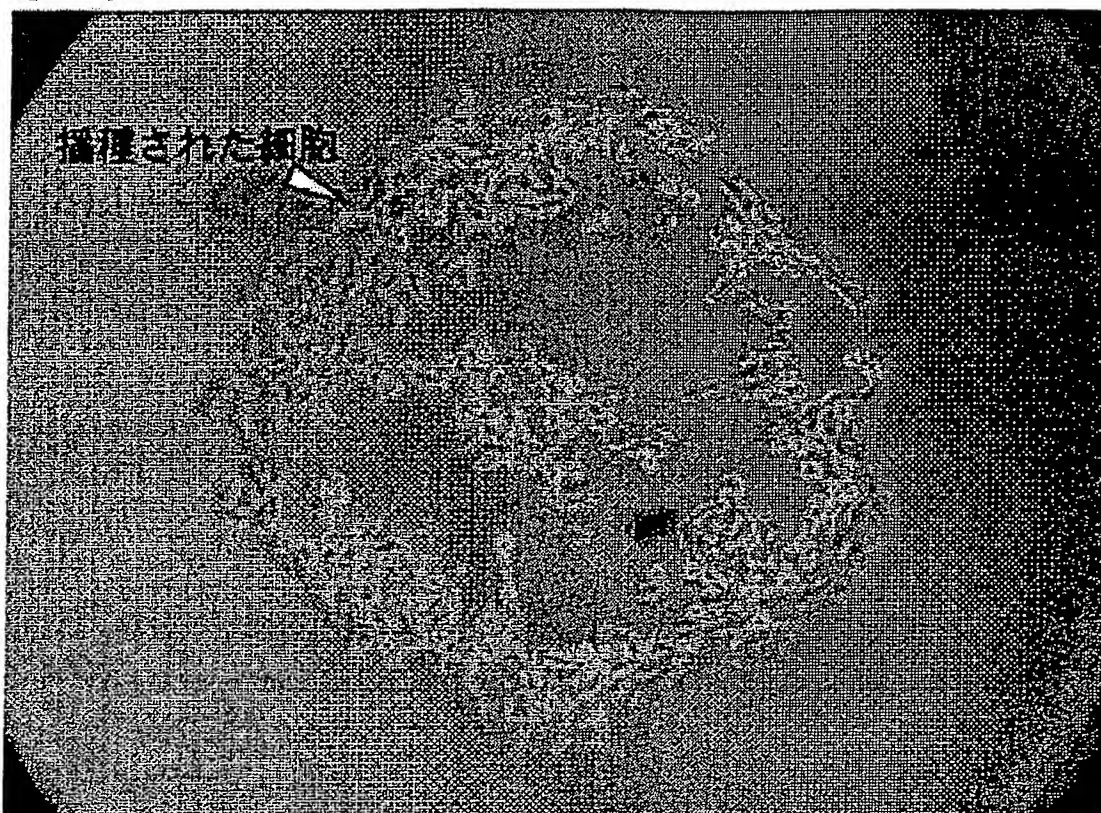
【図5】



【図6】



【図7】



【図8】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】細胞のハンドリング操作方法等を提供する。

【解決手段】細胞育成中の細胞培養容器内の細胞採取 site に微小成形体を留置することにより、細胞育成に資する細胞育成環境を微小成形体に取り込むと共に、細胞を微小成形体側に接着、増殖させて、得られた微小成形体-細胞複合体を用いて、細胞を微小成形体ごとハンドリング操作する方法であって、(1)微小成形体を、細胞採取 site に留置する行程、(2)微小成形体に、細胞採取 site の細胞育成環境を、微小成形体側に取り込ませる行程、(3)微小成形体に取り込ませた細胞育成環境中に、細胞を浸潤・増殖させ微小成形体・細胞複合体を調製する行程、(4)上記微小成形体-細胞複合体を回収し、任意の培養環境に移動する行程、(5)上記培養環境で細胞を培養する行程、からなる細胞操作方法、及びその微小成形体。

【選択図】図 1

【書類名】 手続補正書
 【整理番号】 336N03106
 【提出日】 平成15年12月 9日
 【あて先】 特許庁審査官 殿
 【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003-388637
 【補正をする者】
 【識別番号】 301021533
 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所
 【代表者】 吉川 弘之
 【連絡先】 部署名 独立行政法人産業技術総合研究所 産学官連携部門中部
 産学官連携センター 担当者 杉浦宏幸 電話番号 052-
 736-7058

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書
 【補正対象項目名】 0004
 【補正方法】 変更
 【補正の内容】
 【0004】

近年、特に、再生医療分野において、培養細胞を有用な形態（シート状、塊状）で回収する方法が強く求められている。上記要求に答える技術として、細胞を細胞非接着物質上で浮遊培養する方法、もしくは細胞弱接着基材上から自然剥離した細胞を凝集させる方法が報告されている。また、上記方法に関連して、32℃以上の温度で収縮するPoly (N-isopropyl acrylamide) 薄層上で細胞を培養し、コンフルエントになったところで加熱し、シート状細胞を回収する方法が報告されている（例えば、非特許文献2）。また、遠心による細胞ペレット化と、ペレット化細胞の浮遊培養を繰り返すことにより、高密度細胞凝集塊を得る方法が研究されている（例えば、非特許文献3）。しかし、上記方法により作製された細胞シート及び細胞凝集塊は、非常にデリケートであり、例えば、ピンセット等によるハンドリングを要求される臨床応用には耐えない。

【手続補正2】

【補正対象書類名】 明細書
 【補正対象項目名】 0005
 【補正方法】 変更
 【補正の内容】
 【0005】

【特許文献1】特開昭59-67965号公報

【特許文献2】特開平10-248557号公報

【非特許文献1】L. Ikonouetal., BIOTECHNOLOGY PROGRESS 18 (6), p.1345-1355 NOV-DEC 2002

【非特許文献2】T. Okano et al., J. Biomed.Mater. Res., Vol. 27, p. 1243-1251, 1993

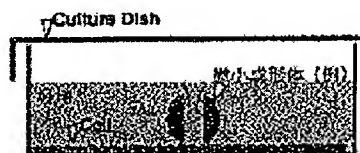
【非特許文献3】Y. Kato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 9552, 198

CELL PICKING TOOL COMPRISING MOLDED PRODUCT HAVING CONCAVED STRUCTURE FOR CELL ADHESION AND METHOD FOR OPERATING CELL**Publication number:** JP2005168496**Publication date:** 2005-06-30**Inventor:** TERAOKA HIROSHI; SAITO TAKAO**Applicant:** NAT INST OF ADV IND & TECHNOL**Classification:****- international:** C12M3/00; C12N5/06; C12M3/00; C12N5/06; (IPC1-7):
C12M3/00; C12N5/06**- european:****Application number:** JP20040335513 20041119**Priority number(s):** JP20040335513 20041119; JP20030388637 20031119[Report a data error here](#)**Abstract of JP2005168496**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a molded product for cell collection (cell picking tool) capable of picking up cultured cells which are in a proper culturing environment, together with the proper culturing environment and transferring them to an objective culturing environment together with the molded article, and to provide a method for subculturing the cultured cells cultured in a culturing container such as a laboratory dish to the other culturing environment by using the cell picking tool.

SOLUTION: This invention relates to the molded product for cell collection (cell picking tool) and the operating method for the same, which molded product has a concaved structure capable of picking up a cell sheet obtained by two dimensional culture in a culture container while keeping the sheet state as it is without using a cell dispersing agent, wherein the molded product is capable of taking in a liquid component for cell cultivation (cell culturing environment) and collecting cells to the concaved structure while keeping the cells in a state of aggregation by arranging the molded product to contact with a cell assembly in the cell culturing environment.


COPYRIGHT: (C)2005,JPO&NCIP



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Cell picking tool including molding with cell-adhesive recessed structure and method of cell manipulation**Publication number:** GB2422844**Publication date:** 2006-08-09**Inventor:** TERAOKA KAY (JP); SAITO TAKAO (JP)**Applicant:** NAT INST OF ADVANCED IND SCIEN (JP)**Classification:****- international:** C12M3/00; C12N5/02; C12N11/00; C12N11/02;
C12M3/00; C12N5/02; C12N11/00;**- european:** C12N11/00**Application number:** GB20060009620 20041119**Priority number(s):** WO2004JP17266 20041119; JP20030388637 20031119**Also published as:** W 02005059117 (A1)**Report a data error here****Abstract of GB2422844**

A cell collection tool, etc. There is provided a cell collection molding (cell picking tool) with recessed structure capable of collecting sheets of cells having been two-dimensionally cultured in a culturing vessel in the form of sheets without the use of cell dispersants, which cell collection molding is stationed so as to be in contact with cell assembly lying in a cell growing environment to thereby not only introduce a liquid component (cell growing environment) contributing to cell growth but also enable collection of the cells with their gathered form retained into the recessed structure. There is further provided a method of manipulating the same.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.